

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071151871

UDC

厦门大学

_____硕士_____学 位 论 文

蛋白质组学技术研究在甲基对硫磷胁迫下 黄鳍鲷肝组织表达的差异蛋白质

Differential proteins of Liver Tissues Revealed with
Proteomics in *Sparus latus* under the Stress of Methyl
Parathion

陈海滨

指导教师姓名: 黄 河 清 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2010 年 6 月

论文答辩时间: 2010 年 6 月

学位授予日期: 2010 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录	I
中文摘要	VII
Abstract	IX
1 前言	1
1.1 有机磷农药污染概述	1
1.1.1 有机磷农药的毒性	2
1.1.2 有机磷农药毒理学研究	3
1.1.3 甲基对硫磷及其生物学毒性	5
1.1.4 甲基对硫磷与氧化应激	6
1.2 有机磷农药水体污染监测与生物标志物	8
1.2.1 酶标志物	9
1.2.2 细胞内小分子抗氧化物质	9
1.2.3 细胞与核酸标志物	9
1.2.4 铁蛋白捕获重金属离子与有机小分子	10
1.3 蛋白质组学及其研究方法	10
1.3.1 蛋白质组学产生的背景及相关概念	10
1.3.2 目前国内外蛋白质组学的研究策略与范畴	11
1.3.3 蛋白质组学的研究技术	13
1.3.3.1 蛋白质组样品制备	13
1.3.3.2 蛋白质组样品分离技术	14
1.3.3.3 蛋白质鉴定技术	15
1.3.3.4 生物信息学在蛋白质组学上的应用	19
1.4 蛋白质组学在环境污染监测中的应用	19
1.5 本论文主要研究内容和意义	20
2 材料与方法	22

2.1 材料	22
2.2 仪器与试剂	22
2.2.1 主要仪器设备	22
2.2.2 主要试剂	23
2.3 实验方法	24
2.3.1 甲基对硫磷的质谱分析	24
2.3.2 CAT、AchE、SOD 酶活性的分析	25
2.3.2.1 黄鳍鲷各组织的样品制备	25
2.3.2.2 CAT 活力的测定	25
2.3.2.3 AchE 活力的测定	26
2.3.2.4 SOD 活力的测定	27
2.3.3 蛋白质组学技术研究甲基对硫磷诱导下黄鳍鲷肝差异表达的关键蛋白 质	28
2.3.3.1 差异蛋白质组学实验步骤	28
2.3.3.2 差异蛋白质的免疫印迹验证	34
2.3.3.3 差异蛋白质的 Real Time-PCR 验证	36
3 结果与讨论	41
3.1 甲基对硫磷在黄鳍鲷各组织残留量的测定	41
3.1.1 标准曲线的测定	41
3.1.2 样品检测	41
3.2 甲基对硫磷对黄鳍鲷体内各种酶活性的影响	43
3.2.1 甲基对硫磷对黄鳍鲷脑 AchE 活性的影响	43
3.2.2 黄鳍鲷脑 AchE 活性作为生物学标志物的可行性	45
3.2.3 甲基对硫磷对黄鳍鲷肝 CAT 活性的影响	45
3.2.4 甲基对硫磷对黄鳍鲷肝 SOD 活性的影响	46
3.2.5 甲基对硫磷胁迫下黄鳍鲷肝 SOD 与 CAT 活性的变化规律	47
3.2.6 甲基对硫磷胁迫下黄鳍鲷 AchE、SOD 和 CAT 活性变化规律的比较	48
3.3 甲基对硫磷胁迫下黄鳍鲷肝组织差异蛋白质的鉴定与分析	48
3.3.1 用于分离鱼肝组织全蛋白的双向凝胶电泳技术的优化	49

3.3.1.1 二维胶交联度的选择	49
3.3.1.2 二维胶蛋白斑点扭曲现象的避免	51
3.3.1.3 电泳中核酸干扰的去除	52
3.3.1.4 不同蛋白制备方法的比较	53
3.3.1.5 差异蛋白质组学技术优化	54
3.3.2 甲基对硫磷胁迫下黄鳍鲷肝组织的差异蛋白质组研究	55
3.3.3 甲基对硫磷胁迫下 methionine adenosyltransferase I alpha 表达量上调的 免疫印迹验证	61
3.3.4 甲基对硫磷胁迫下 peroxiredoxin 2 表达量上调的荧光定量 PCR 验证	63
3.3.5 甲基对硫磷胁迫下差异蛋白鉴定结果分析	65
3.3.5.1 甲基对硫磷胁迫下细胞骨架的变化	65
3.3.5.2 甲基对硫磷胁迫下参与代谢的差异蛋白变化	65
3.3.5.3 甲基对硫磷与细胞氧化还原稳态	68
4 小结	72
缩略语表	74
参考文献	75

Contents

Chinese abstract	IV
English abstract	X
1 Introduction	1
1.1 Overview of OPs pollution	1
1.1.1 The biological toxicity of OPs	2
1.1.2 The toxicology research of OPs	3
1.1.3 The biological toxicity of MP	5
1.1.4 MP and oxidative stress	6
1.2 Monitoring MPs water pollution and biomarkers	8
1.2.1 Enzyme markers	9
1.2.2 Intracellular small antioxidants	9
1.2.3 The biomarkers of cell and nucleic acid	9
1.2.4 Heavy metal ions and small organic molecules captured by Ferritin	10
1.3 Progress study on proteomics	10
1.3.1 The background of proteomics	10
1.3.2 Domestic and international strategies of proteomics research	11
1.3.3 Proteomics technology	13
1.3.3.1 Protein sample preparation	13
1.3.3.2 The separation of protein sample	14
1.3.3.3 Identification technology of protein	15
1.3.3.4 Bioinformatics applications on proteomics	19
1.4 Application of proteomics in enviromental pollution monitoring	19
1.5 Significance and content of this thesis	20
2 Materials and methods	22
2.1 Materials	22
2.2 Equipment and reagent	22

2.2.1 Main equipments.....	22
2.2.3 Main reagent	23
2.3 Methods	24
2.3.1 Methyl parathion determinated by GC	24
2.3.2 CAT、AchE、SOD enzyme activities assay	25
2.3.2.1 Preoaration of fish tissues homeenates.....	25
2.3.2.2 CAT enzyme activity assay	25
2.3.2.3 AchE enzyme activity assay	26
2.3.2.4 SOD enzyme activity assay	27
2.3.3 Identification of differentially expressed key proteins induced by MP in Sparus latus liver by proteomics technologies.....	28
2.3.3.1 Main process of proteomics.....	28
2.3.3.2 Western blotting analysis of differentially expressed proteins.....	34
2.3.3.3 RT-PCR analysis of differentially expressed proteins	36
3 Results and discussion	41
3.1 MP distribution in the tissues of Sparus latus	41
3.1.1 Standard Curve.....	41
3.1.2 Sample test	41
3.2 Effect of MP on enzyme activities of Sparus latus.....	43
3.2.1 Effect of MP on the AchE activity in the brain of Sparus latus	43
3.2.2 The feasibility of the AchE activity in the brain of Sparus latus as a biomarker	45
3.2.3 Effect of MP on the CAT activity in the liver of Sparus latus	45
3.2.4 Effect of MP on the SOD activity in the liver of Sparus latus.....	46
3.2.5 The change trend of SOD and CAT activities induced by MP	47
3.2.6 Compared to the change trend of AchE SOD and CAT activities induced by MP.....	48
3.3 Identification and analysis of differentially expressed key proteins induced by MP in Sparus latus liver.....	48

3.3.1 Optimistic strategies for 2D-PAGE.....	49
3.3.1.1 Optimistic T % for SDS-PAGE.....	49
3.3.1.2 Avoid the problems of spots distortion	51
3.3.1.3 DNA and RNA contamination removal.....	52
3.3.1.4 Comparison of different methods of protein preparation	53
3.3.1.5 Optimization strategies for differential proteomics technologies.....	54
3.3.2 The differential proteomics of Sparus latus liver induced by MP	55
3.3.3 Western blotting analysis of the differentially expressed MAT	61
3.3.4 RT-PCR analysis of the differentially expressed PRX.....	63
3.3.5 Analysis of differential expressed proteins	65
3.3.5.1 The changes of the cytoskeleton induced by MP	65
3.3.5.2 The differentially expressed proteins involved in metabolism induced by MP	65
3.3.5.3 MP and cell redox homeostasis	68
4 Conclusion	72
Abbreviations	74
References	75

中文摘要

由于甲基对硫磷 (Methyl parathion, MP) 具有药效高、品种防治对象多等特点, 现已成为全球农业生产过程中使用最为广泛的一类杀虫剂。近几十年来, 由于人类对 MP 的滥用, 导致大量 MP 进入河流、湖泊, 并最后汇入海洋; 对人、陆海动物、植物和微生物的生存与延续产生严重危害。监控环境中有机磷农药的污染程度和危害性是预防与治理有机磷农药污染的关键举措之一, 监控有机磷农药污染程度的常见方法有化学法、生物法和物理法, 其中组织酶活性和残留量分析为最常用的方法。

目前, 国内外有关有机磷农药对动植物及微生物机体内的超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性影响已进行过大量的研究, 并有详细的研究报道。本文同样也选择这三种酶活性为监控对象, 发现在 MP 胁迫下, 黄鳍鲷 (*Sparus latus*) 肝脏中 SOD 与 CAT 活性的变化趋势均呈现先上升后下降规律, 这一现象说明了黄鳍鲷通过自身的应激系统对 MP 毒性产生了拮抗作用。在 MP 胁迫下, 黄鳍鲷肝脏内产生了大量的活性氧 (ROS), 并通过提高机体 SOD 和 CAT 酶活性的途径, 形成防御 ROS 损害的第一道防线, 从而产生了氧化应激现象。在脑 AChE 活性的监控中, AChE 活性变化趋势不同于 SOD 和 CAT, 其变化规律与受胁迫时间呈明显的负相关性。这说明了, 黄鳍鲷 SOD、CAT 和 AChE 酶活性均适合作为监控有机磷农药污染程度和危害性的酶蛋白指示物, 但 AChE 酶活性要比 SOD 和 CAT 更加有效、准确和适用。

选用气相色谱法探讨在 MP 胁迫下, 黄鳍鲷的肝、肌肉、脑组织中 MP 的残留量与分布情况, 其中肝脏中 MP 含量最高, 约高于其他组织器官近 3 倍, 呈现高富集迹象。因而选择黄鳍鲷肝脏组织作为研究素材, 并采用蛋白质组学技术筛选与鉴定 MP 胁迫黄鳍鲷肝组织表达的差异蛋白, 从中筛选出有意义的蛋白指示物的研究思路, 比较科学合理。

蛋白质组学技术是目前高通量筛选与鉴定重要蛋白质的最佳分析技术之一。本文采用蛋白质组学技术分析在 MP 胁迫前后, 黄鳍鲷肝组织所表达的差异蛋白, 共获得 25 个差异蛋白质, 并选用肽质量指纹图谱 (PMF) 进行逐个鉴定,

其中 16 个差异蛋白质斑点获得较有意义的鉴定结果，按其功能可分为五大类：参与细胞骨架系统、代谢系统、细胞氧化平衡系统、信号传导系统和细胞内蛋白质运输系统。其中细胞骨架系统、代谢系统、及细胞氧化平衡系统的相关蛋白共占了差异蛋白总数目的 87.5 %。细胞骨架系统主要有肌动蛋白及胶质纤维酸性蛋白。在参与代谢系统的蛋白中，烯酰辅酶 A 水合酶和烯醇酶因 ROS 的氧化作用，导致表达量的下调，引起 ATP 含量的下降，而果糖-1, 6-二磷酸酶、糖原磷酸化酶、甲硫氨酸腺苷转移酶表达量的上调，又加速了 ATP 的产生从而抵抗 ROS，对组织起到保护作用；参与细胞氧化还原平衡调控的还有过氧化物还原酶、蛋白质二硫键异构酶和苯丙氨酸羟化酶，认为这些差异蛋白是由细胞氧化还原失衡而产生，并参与了氧化应激或氧化应激相关疾病的形成。

本文还选用 Western blotting 验证差异蛋白质甲硫氨酸腺苷转移酶表达量上调趋势，选用 RT-PCR 方法验证了过氧化物还原酶表达量上调的规律。这些实验结果进一步提高了对已筛选和鉴定的差异蛋白的可信度。初步认定过氧化物还原酶、甲硫氨酸腺苷转移酶、蛋白质二硫键异构酶适合于作为监测与评价 MP 污染程度及危害性的蛋白指示物，潜在着应用前景。

关键词：甲基对硫磷；蛋白质组学；氧化应激

Abstract

Methyl parathion (MP) has become one of the most widely used insecticides in the world due to its high efficacy and wide applicability. Currently, the abuse of MP causes a large number of MP into the rivers, lakes and oceans, which is seriously harmful to the survival and continuity of the humanbeings, animals, plants and microorganism. Monitoring the pollution degree and hazardness of organophosphorus pesticide is one of the key measures in proventing and controlling organophosphorus pesticide pollution. The common methods, which are used to monitor the organophosphorus pesticide pollution degree, are chemicalmethod, biologicalmethod and physicalmethod. The enzyme activity of tissue and residual quantity are the most common analysis methods.

It has been reported that the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and acetylcholinesterase (AChE) in plants and microorganisms are influenced by organophosphorus pesticide. In this paper the activities of the above enzymes were also chosen as the monitoring objects. The activity change trend of SOD and CAT in the liver tissue of *Sparus latus* was similar under the stress of MP, which increased firstly and then decreased. It was indicated that *Sparus latus* had some antagonism to MP toxicity through its own stress system. Under the stress of MP, abundance reactive oxygen (ROS) was producted in the liver of *Sparus latus*, and the increased activity of SOD and CAT was probably the first defence against ROS damage, which formed the oxidative stress. The activity change of AChE in the brain tissue of *Sparus latus* was not the same as that of SOD and CAT. The trend of AChE activity and the stress time were negatively correlated, which indicated that the activities of SOD, CAT and AChE were all suitable as protein indicators for monitoring organophosphorus pesticide pollution degree and hazardness, but the activity of AChE was more effective, accurate and appropriate than that of SOD and CAT.

MP residual quantity in *Sparus latus* tissues was estimated by Gas Chromatography. After analysing MP residual deposition of three tissues, brain, liver and muscle, we found that MP was obviously enriched which was up to 3-fold in liver tissue. So the

liver tissue was chosen for the research material, and the proteomics technology was used to screen and identify the suitable and potential protein indicators for detecting the pollution degree and hazardness under MP stress, and this research idea is more scientific and rational.

Proteomics technology is one of the best analytical technology for high-throughput screening and identifying important proteins. Proteomics technology was used to analyse the differential proteins expressed by the liver induced by MP. And 25 differential protein spots were identified by peptide mass fingerprint (PMF), 16 of which obtain more meaningful results. The identified proteins had roughly been classified into 5 groups according to their functions: cell redox homeostasis, metabolism process, cytoskeleton system, intracellular protein transport and signal transduction. Proteins related in cell redox homeostasis, metabolism process and cytoskeleton system accounted for 87.5% of total. Actin and glial fibrillary acidic protein are involved in cytoskeleton system. The expression of enoyl-Coenzyme A hydratase and enolase involved in metabolism process is down-regulated because of ROS oxidation, which caused the decline in ATP content. But the expression of fructose-1,6-bisphosphatase, phosphorylase and methionine adenosyltransferase is up-regulated, which accelerates the production of ATP to protect against the ROS damage. Peroxiredoxin, phenylalanine hydroxylase and disulfide-isomerase A3 are involved in the regulation of cell redox system. It is considered that these differential proteins are caused by cellular redox imbalance and participate in the oxidative stress or the illness related in the oxidative stress.

Western blotting was then used to verify the up-regulated expression of methionine adenosyltransferase induced by MP, and RT-PCR was used to verify the up-regulated expression of peroxiredoxin induced by MP. These results furtherly increased the credibility of the screened and identified differential proteins. Peroxiredoxin, methionine adenosyltransferase and disulfide-isomerase A3 were considered as protein indicators to monitor MP pollution degree and hazardness, which has the potential application values.

Key words: Methyl parathion; Proteomics; Oxidative stress

1 前言

1.1 有机磷农药污染概述

有机磷农药 (Organophosphorus pesticide, OPs) 是德国人于二十世纪三十年代首先合成和使用的一类杀虫剂^[1]。过去三十多年来, OPs 由于具有药效高、品种防治对象多、在环境中易降解、残毒低等特点, 而逐步取代曾经大量使用的有机氯农药, 成为世界范围内使用最广泛的一类杀虫剂, 也是目前我国最主要使用的农药类型之一^[2]。已经开发的 OPs 有 60 余种^[3], 其中我国可以生产 30 多种, 产量占全国农药总产量的 40% 以上。在农业生产中使用的 OPs 占农药总使用量的 77.76%^[4]。OPs 主要用作农业杀虫剂, 少数品种用作杀菌剂、除草剂和脱叶剂^[5]。在我国的渔业生产中, 也常使用 OPs 试剂 (辛硫磷、马拉硫磷和敌敌畏等) 杀灭水生动物体外寄生虫等敌害生物。但是, 目前, 我国的农药品种结构尚不合理, 表现为杀虫剂占农药总量的 70%, 其中 OPs 占杀虫剂总量的 70%, 而甲胺磷、甲基对硫磷、对硫磷、氧化乐果、久效磷等高毒杀虫剂又占 OPs 总量的 70%, 这被称为农药品种结构不合理的“3 个 70%”^[6]。由于农药品种结构不合理, 使用方法不当, 以及对农药残留监管不力, 过多过滥使用农药, 导致大量 OPs 进入河流、湖泊、海洋等各种水体, 对人、动物和环境产生严重危害^[7]。据调查, 农田中喷洒的 OPs 只有 10%~20% 附着在作物表面, 大部分残留在土壤或漂浮在空气中, 通过降雨、沉降和径流进入河流湖泊, 并最终汇入海洋, 造成地表水的 OPs 污染^[8]。虽然 OPs 的半衰期较短, 但是也会危害非靶生物, 大多数水生生物对 OPs 十分敏感^[9], 某些种类的 OPs 降解过程中还能产生毒性更大的产物^[10]。最近二十年, 近岸海域的 OPs 污染造成鱼、虾、贝大批死亡的事故频发, 近岸养殖品种数量锐减甚至灭绝, 威胁到海水养殖业的可持续发展。OPs 不仅污染环境危及生物生长, 最终也会通过食物链进入人体, 影响人类健康。

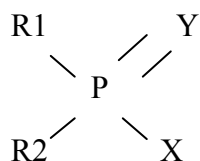
对厦门市以及周边地区水体的有机磷污染情况, 先前已经有多篇研究论文专门讨论。1999 年, 张珞平等通过模型对厦门地区农药的地球化学行为、分布及其产生的结果进行预测计算, 并对沿岸海域环境进行了初步的环境风险评价, 发

现虽然有机氯农药毒性较大,但厦门地区用量小;而有机磷农药用量较大,并因其亲水性强,毒性较大,对厦门海域生态系统产生危害的风险最大^[11]。2002年,张祖麟等对福建河口水体中有机磷农药的风险进一步进行了评价。通过分析九龙江口水体中17种有机磷农药的含量与行为特征,认为甲胺磷、氧乐果、敌敌畏等农药对福建河口的生态环境安全已经构成一定的威胁^[12]。

1.1.1 有机磷农药的毒性

有机磷农药的应用始于上世纪的上半叶,由于有机磷类杀虫剂具有高效、低成本、作用谱广等优点,在随后的半个多世纪里,有机磷农药的研究和生产得到了迅速的发展,并成为世界上最主要的化学农药之一^[13,14,15]。

有机磷农药绝大多数品种为磷酸酯类化合物,其化学结构通式为:



式中 R1 和 R2 大多数为甲氧基或乙氧基,亦可为苯基或其他基团;Y 一般为氧或硫原子;X 为烷氧基、芳香基、卤基或杂环取代基。由于代入的基团不同,可形成多种多样化合物。各种化合物的毒性大小与其化学结构中 R、X、Y 基团的改变有关。

农药对水生生物的毒性是评价其环境危害程度的重要指标,主要包括急性毒性和慢性富集性危害两项指标,这种危害可以体现在水生植物和水生动物上。有机磷农药对水生植物的影响主要在于抑制其生长和繁殖,Pisca等发现湖泊中的自养生物受到乐果的影响后,光合作用被抑制,进而导致湖泊自养生物的总产量和净产量的降低^[16]。唐学玺则认为,有机磷胁迫使微藻细胞的膜脂过氧化作用加强,进而导致细胞膜结构的破坏和功能的丧失,这是对细胞形成伤害并抑制其生长繁殖的原因之一^[17]。

急性中毒在水生动物上的表现更为明显,对于鱼类,会出现急躁不安,有狂游冲撞等剧烈现象,随后表现出游泳不稳定,呼吸困难,最后痉挛麻痹、失去平衡等异常行为,直至昏迷死亡。此外还常伴有粘液增加,体色变黑等症状^[18,19]。不同种类有机磷农药以及其对不同种类的鱼,引发急性中毒的剂量也是不尽相同的。比如三唑磷对生活在沿岸水域几种鱼类的毒性次序为:梭鱼> 大弹涂鱼> 鲈

鱼> 日本鳗鲡苗^[20]；洪万树等使用5种有机磷农药对黄姑鱼胚胎和仔鱼毒性的研究发现，甲胺磷对胚胎的毒性最大，乐果对胚胎的毒性最小，敌百虫和敌敌畏对仔鱼的毒性大于其他3种有机磷农药，敌百虫、敌敌畏、甲胺磷和呋喃丹对仔鱼的毒性大于对胚胎的毒性，而乐果对仔鱼和胚胎的毒性基本相似^[21]。

除了急性中毒，有机磷在体内的慢性积累也不可忽视。在6 mg/L 的马拉硫磷中生活10 d后，囊鳃鲇的各组织器官中，以鳃的马拉硫磷残留量最大，其次为肝脏、胰脏，而肌肉中含量很低。在处理初期，农药残留量随染毒时间延长而逐步上升，达到一定量后，反而急剧减少^[22]。此外，有机磷农药可以导致内分泌功能失调，影响性腺发育和分泌。Kling研究杀螟硫磷对性成熟罗非鱼的影响时发现卵成熟受到杀螟硫磷的抑制，卵径大大低于正常值，卵黄含量降低，生育力低下^[23]。

1.1.2 有机磷农药毒理学研究

有机磷农药主要产生神经性毒性，作用于昆虫及高等动物体内的乙酰胆碱酯酶（acetylcholinesterase, AchE），中毒时有机磷的磷原子与AchE酯解部位的丝氨酸上的氧原子结合，形成共价键；同时酯键断裂，磷酰基与AchE结合形成磷酰化酶，这时AchE分子便失去活性力而不能再催化水解乙酰胆碱（acetylcholine, Ach），一般将失去活性的磷酰化酶称为中毒酶^[24]。由于Ach是神经突触的信号传递介质和高等动物神经肌肉接头的递质，AchE活性被抑制后，Ach不能被及时分解而在突触间隙内堆积，信号传递被阻断，使得动物出现运动障碍、呼吸麻痹的中毒症状，最终导致动物死亡。另一方面，由于AchE的活性表达与轴突的延伸有关，AchE能增强神经轴突的生长，因而在AchE活性被有机磷农药抑制后，即使未致死亡，机体神经细胞的生长发育也受到阻碍。研究发现，毒死蜱可以抑制PC12细胞的有丝分裂和轴突的长出，抑制神经细胞DNA的合成，在远低于使AchE活性丧失所需要的浓度时即可引起与脑发育有关的分子——磷酸化的Ca²⁺/cAMP介导的反应元件结合蛋白CREB的活性增加。可见，有机磷杀虫剂不仅具有胆碱能毒性，还具有非胆碱能毒性作用^[25]。实际上，有机磷农药除了直接抑制乙酰胆碱酯酶外，还有抑制乙酰胆碱受体（AchR）的功能。用毒死蜱的所做的实验表明，有机磷不仅可以抑制脑突触体的蕁毒碱型AchR，还可以抑制烟碱型AchR的功能。由于有机磷与AchR结合，使AchR不能结合乙

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库